Lane Medical Library
1926

Aus dem Hygienischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf.
(Direktor: Prof. Dr. Bürgers.)

Studien über Vitalfärbung von Bakterien.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

veterinärmedizinischen Fakultät

der

Landes-Universität Giessen

vorgelegt von

Karl Dahmen
Tierarzt aus Rödingen, Kreis Jülich.

Giessen 1926
v. Münchow'sche Univ.-Druckerei Otto Kindt.

67

Gedruckt mit Genehmigung der veterinär-medizinischen Fakultät
zu Gießen.
Referent: Geh. Reg. Rat, Prof. Dr. Olt.

Der Begriff »Vitalfärbung« wird in einzelnen Wissenschaftszweigen recht verschieden aufgefaßt. Bei näherem Betrachten der ziemlich umfangreichen Literatur über Vitalfärbung ist dies auch wohl verständlich. Denn wie Fischel mit Recht hervorhob, kann man oft ein absolut sicheres morphologisches Merkmal des »Lebens« histologischer Elemente nicht angeben. Dieser Satz gilt ganz sicher für die sogenannte Vitalfärbung von Metazoen, Protozoen und Pflanzen. Ob er auch für Bakterien gilt, ist noch nicht ganz sicher erwiesen.

Die zahlreichen zum Teil histologischen, zum Teil physiologischen Zwecken dienenden Vitalfärbungsversuchen haben auch gezeigt, daß bei Pflanzen die in den Zellen enthaltenen Gerbstoffe und Bestandteile des Zellsaftes Farbstoffe binden, während bei Tieren hauptsächlich bestimmte Zellarten und zwar nur in bestimmten Granula, Farbe vital aufnehmen. Dabei herrscht noch keine einheitliche Auffassung über die Frage, ob diese Granula in der Zelle schon vorhanden (Aschoff, Kiyono) oder aus der Farbe selbst durch Ausfällung entstehen. (Schulemann). Sehen wir von den wahrscheinlich recht komplizierten Vorgängen bei Pflanzen und Tieren vollkommen ab, und suchen den Begriff der Vitalfärbung bei Bakterien theoretisch zu definieren, so können wir sagen: »Vitalfärbung« besteht in einer Aufnahme von kristalloiden oder kolloidalen Farbstofflösungen, wobei die Lebensfunktionen des Bakteriums in keiner Weise behindert werden. Daß dieser Vorgang dem Auge sichtbar wird, ist bei dieser Begriffsbestimmung nicht ohne weiteres vorausgesetzt. Es sei bei dieser Gelegenheit darauf hingewiesen, daß nicht zu konzentrierte Farblösungen schon in dünner Schicht für das Auge nicht wahrnehmbar werden können, was zu Beobachtungsfehlern führen kann.

Der Mechanismus der Farbstoffaufnahme hat weitgehend die Theorie der Stoffaufnahme in Zellen befruchtet. Erinnert

sei an Ehrlich's Farbenstudien, welche in seiner Schrift »Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus« niedergelegt sind. Daran schlossen sich die Untersuchungen Spiros, H. Meyer, besonders aber Overton's. Letzterer stellte die Theorie auf: Alle Substanzen, welche in Fetten, Oel oder ähnlichen Lösungsmitteln leicht löslich sind, werden von der lebenden Zelle rasch aufgenommen, die unlöslichen oder schwer löslichen nicht oder sehr langsam, sofern ein aktives Eingreifen des Protoplasmas bei der Aufnahme ausgeschlossen ist. Overton fand auch, wie viele andere vor ihm, und nach ihm (Heidenhain, Arnold, Ribbert, Möllendorf), daß im großen und ganzen basische Farbstoffe schnell, Sulfosäurefarbstoffe schlecht oder garnicht eindringen. Erstere sollen als Salze der Farbstoffe – in Oelen und Cholesterin gut löslich – aufgenommen werden, während die in Oel, Cholesterin Terpentin, Xylol etc. schwer löslichen Sulfosäurefarbstoffe aus diesem Grunde schlecht eindringen. Diese Hypothese blieb nicht ohne Widerspruch. Höber behauptete, daß für die lipoid-löslichen Stoffe jede Zelle zu jeder Zeit durchlässig sei, für die lipoidunlöslichen Stoffe aber sei die Zelle bald offen, bald geschlossen, die einen mehr, die anderen weniger. Mehr erschüttert aber wurde die Overston'sche Theorie durch die Versuche Ruhland's, welcher zeigte, daß einmal intakte Cholesterinmembranen und nicht gequollene Lecithin- oder Lecithin-Cholesterinen überhaupt keine Farbstoffe permeiren lassen, im gequollenen Zustand aber alle Farbstoffe durchtreten, daß ferner eine Reihe von Farbstoffen den Overton'schen Gesetzen nicht unterliegen. Die zahllosen Färbungsversuche an Nieren brachte Höber zu der Theorie: Wenn ein Farbstoff wenig bezw. nicht colloidal ist, wird er leicht aufgenommen; wenn ein Farbstoff hydrophil-colloidal ist, wird er ebenfalls leicht aufgenommen; wenn ein Farbstoff von den Nierenzellen nicht oder schwer aufgenommen wird, so ist er suspenscolloidal, letzter Satz gilt aber nicht umgekehrt. In neue Bahnen gelangte die Vitalfärbung durch die sehr schönen Versuche Goldmann's, welcher zeigte, daß auch Sulfosäurefarbstoffe (Trypanblau, Pyrrolblau) elektiv vital färbten. Diesen Farbstoffen konnte Schulemann in gründ-

lichen Arbeiten noch eine ganze Reihe an die Seite stellen. Während Schulemann ursprünglich das Vitalfärbungsvermögen als indirekt abhängig von der chemischen Konstitution, bezw. den physiko-chemischen Charakter der Farblösung bezeichnete, wies er in den letzten Jahren, ebenso wie Ruhland auf den großen Parallelismus zwischen Diffusion in Gelen und Vitalfärbungsvermögen hin. Auf die sehr interessanten Versuche von Küster, Löwe und Traube (Oberflächenaktivität) soll hier nicht näher eingegangen werden. Auf jeden Fall sind, was den Farbstoffaufnahmemechanismus angeht, auch heute noch nicht alle Fragen geklärt, was durch die Verwendung der verschiedenen Farbstoffe mit verschiedenen physikochemischen Eigenschaften, zum Teil durch die Verwendung verschiedenartiger Objekte bedingt ist. Von großem Werte für die Vitalfärbung von Bakterien waren zur Zeit die Arbeiten von Eisenberg. Den Ausgangspunkt von Untersuchungen von Eisenberg bilden Beobachtungen mit einer Farbmischung bestehend aus gesättigter Chinablau- und Cynosinlösung. Eisenberg fand bei dieser Färbung, wie sich die Kleinlebewesen in charakteristischer Weise abheben, wobei nämlich die grampositiven Arten eine mattgelbe, orangerosa bis tiefrote Färbung aufweisen, die gramnegativen Arten allerdings ungefärbt bleiben. An Mischungen von grampositiven und gramnegativen Arten wies er den Unterschied der Farbaufnahme sehr deutlich nach.

Besondere Schwierigkeiten bereitet ein Punkt, der auch sonst Zweifel aufkommen läßt, die Feststellung der Lebendfärbung. Ein allgemein gültiges morphologisches Kennzeichen des ungeschädigten Lebens gibt es ja auch bei Bakterien nicht. Von biologischen Kennzeichen des Lebens wäre vor allem die Beweglichkeit mancher Bakterienarten zu berücksichtigen. Doch hier drängen sich manche Bedenken auf; läßt man nämlich Farbstoffe auf bewegliche Bakterien einwirken, und wird die Bewegung von einem Individuum eingestellt, so ist bei der Empfindlichkeit dieser Funktion kaum ein Schluß auf Absterben des Individuums gestattet. Die Ausschaltung der Bewegung bedeutet noch keine Sicherstellung des Todes. Eisenberg nimmt an, daß geringe Farbstoffmengen von der Bakterien-

zelle aufgenommen und zu Leukoprodukten reduziert werden. Das Reduktionsvermögen der Zelle kann bei dauernder Farbstoffeinwirkung geschwächt werden, Färbung tritt ein, einer weiteren Schwächung folgt mehr oder weniger bald eine Abtötung. Über die Toxizität und Konstitution der Farbstoffe sind folgende Ergebnisse Eisenberg's von Wert: Basische Farbstoffe sind im allgemeinen giftig, Sulfofarbstoffe im allgemeinen ungiftig oder schwachgiftig. Färbung der Bakterien ist ein Adsorptionsprozeß, bei dem, wie bei solchen Vorgängen allgemein, elektrische Potentialunterschiede zwischen Adsorbens und adsorbierten Substanz eine große Rolle spielen. In den gewöhnlich zur Vitalfärbung gebräuchlichen, sehr stark verdünnten Farblösungen war eine Vitalfärbung in kürzerer Zeit nicht zu erzielen, hochprozentige Farblösungen müssen mit Rücksicht auf die Vitalität der Organismen vermieden werden. Eisenberg konnte durch seine Versuche keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Toxizität und Permeabilität der Farbstoffe einerseits und ihrer Lipoidlöslichkeit, ihrem colloidalen Charakter, ihrer Farbstoffschattierung andererseits feststellen. Dagegen schien ihm die Farbstärke und ausgesprochene Acidität von Einfluß zu sein. Ihrer Elektivität nach sind nach Eisenberg die Farbstoffe unter »halbspezifische Desinfektionsmittel« einzureihen. Die Ursache der Elektivität oder Färbung von Bakterien liegt zum Teil in der größeren Permeabilität, zum Teil in dem größeren Speicherungsvermögen der grampositiven Arten für Farbstoffe. Untersuchungen von Seiffert ergaben, daß man durch einen Zusatz von Deuteroalbumose, Serum, Bouillon zu einem Farbstoff denselben derart verändern kann, daß er nur noch in tote, aber nicht mehr in lebende Bakterien einzudringen vermochte. Die Erklärung für dieses Phänomen suchte Seiffert in mechanischen Adsorptionsvorgängen, daß nämlich die Verbindung mit dem Eiweißmolekül offensichtlich dem Farbstoff durch die Bakterienwandung verwehre, erst durch mortale Veränderung würde die Färbung ermöglicht. Somit schien hier ein Weg gewiesen, tote und lebende Bakterien unter dem Mikroskop zu differenzieren. Die Versuche wurden in diesem Sinne fortgesetzt und Seiffert

kam so zu dem Ergebnis, daß Färbversuche an lebenden Bakterien mit einer Farbstofflösung in physiologischer Na Cl im Sinne einer colloidalen Grenzschicht der Bakterien ausfalle. Färbversuche in proteinhaltigen Farblösungen ergaben erhebliche Permeabilitätsunterschiede zwischen lebenden und toten Bakterien, Färbversuche in Congorot zeigten die lebenden Bakterien ungefärbt, die toten dagegen gefärbt. Der Versuch gelang aber nicht immer.

Da nun aber auf dem Gebiete der »Vitalfärbung« noch manches ungeklärt scheint, hielt ich es für angebracht, auf Anregung des Herrn Professors Dr. Bürgers in folgenden Versuchen folgende Fragen erneut zu klären:

1. Ist eine echte vitale Färbung, d. h. ohne jede nachweisbare Schädigung aller biologischen Funktionen bei Bakterien möglich?
2. Wenn nicht, welche Zeit bleiben Bakterien in gefärbtem Zustande lebend bezw. fortpflanzungsfähig?
3. Besteht auch bei Bakterienfärbung Parallelismus zwischen Diffusion und Färbungsvermögen?
4. Welchen Einfluß üben physikalische Reize, besonders Licht aus?
5. Bestehen Beziehungen zwischen Giftwirkung und Färbungsvermögen?

Um grade die Beweglichkeit als Kriterium des Lebens zu benutzen, wurden die ersten Versuche mit nur gut beweglichen Mäusetyphuskulturen angestellt. Als Farbe diente zuerst Methylenblau, später auch andere Farben. Wenn auch bei Methylenblau die Farbstoffaufnahme durch Reduktion verdeckt sein kann, so kann man sich durch Anlegen von Trockenpräparaten (reichlicher Sauerstoffzutritt) doch bis zu einem gewissen Maße vor diesem Beobachtungsfehler schützen.

Versuch 1

(mit gramnegativen Bakterien).

Von Methylenblau wurde eine gesättigte, filtrierte und sterilisierte Lösung in aqua dest. hergestellt, ferner von einer achtzehnstündigen Mäusetyphus Schrägagarkultur mit aqua dest.

eine deutlich getrübte Aufschwemmung. Je 1 ccm von beiden Lösungen wurde zu einer Lösung vermischt. Davon wurden hängende Tropfen gemacht und diese dem Tageslicht ausgesetzt und dasselbe Präparat dauernd beobachtet. Nach drei Stunden trat Totalfärbung ein. Das Wachstum der Bakterien erlosch 28 Stunden nach der Färbung. Die Bewegung sistierte mit dem Eintritt der Färbung.

Zu demselben Versuche wurde statt aqua dest. zunächst physiologische Na Cl als Medium benutzt. Hier trat die Färbung in hängenden Tropfen bei Tageslicht in 4 Stunden ein. Das Wachstum erlosch mit 30 Stunden. Mit der Färbung wurde die Bewegung eingestellt.

Hierauf diente Bouillon als Medium. Die Bakterien färbten sich bei derselben Untersuchungsmethode nach 18 Stunden. Das Wachstum erlosch mit 35 Stunden, die Bewegung mit Eintritt der Färbung. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aussaaten auf Agarplatten gemacht, um die Abtötung festzustellen. Der Versuch ist wiedergegeben in Tabelle 1.

Tabelle 1.

Lösungsmittel	Färbung im hängenden Tropfen nach	Einstellung der Bewegung nach	Kein Wachstum nach der Färbung in
Aqua dest.	3 h	3 h	28 h
phys. NaCl.	4 h	4 h	30 h
Bouillon	18 h	18 h	35 h

Am klarsten sind die Verhältnisse, wenn bei Farbe und Bakterien aqua dest. als Medium vorhanden ist. Man sieht deutlich, daß durch Zusatz von physiologischer Na Cl. und noch mehr von Bouillon die Färbungsdauer eine Verschiebung erfährt. Der Zeitunterschied bei aqua dest. und Bouillon ist in Bezug auf Färbung das sechsfache; die Abtötungszeiten zeigen, wenn auch deutliche, so doch erheblich geringere Unterschiede, was ja leicht verständlich ist.

Versuch 2.

Dieser Versuch ist gewissermaßen ein Ergänzungsversuch zu Versuch 1.

1 ccm gesättigte Methylenblaulösung in aqua dest. und 1 ccm einer Aufschwemmung von Mäusetyphus in Bouillon wurden gemischt. Konzentration also 1 : 1.

Von dieser Mischung wurden Gußplatten hergestellt: Sofort, $^1/_2{}^h$, 1^h, $1^1/_2{}^h$, 2^h, 3^h, 4^h, 6^h, 8^h und zwar mit einer Normallösung auf 10 ccm Agar. Gleichzeitig wurden hängende Tropfen gemacht und dauernd unter dem Mikroskop bei Licht beobachtet. Im Reagensglas waren 8 Stunden nach der Einwirkung des Farbstoffes 80% gefärbt. Im übrigen vergleiche Tabelle 2.

Tab. 2 .... + + + = gutes Wachstum
+ + = schwächeres Wachstum.

Tabelle 2

Beobachtungszeit	Wachstum auf Gußplatten	Färbung im hängenden Tropfen	Färbung im Reagensglas
sofort	+ + +	— —	— —
nach $^1/_2{}^h$	+ + +	10% gefbt.	Einzelne gefärbt
„ 1^h	+ + +	35% „	10% „
„ $1^1/_2{}^h$	+ + +	40% „	20% „
„ 2^h	+ + +	65% „	40% „
„ 3^h	+ + +	100% „	70% „
„ 4^h	+ + +	100% „	70% „
„ 6^h	+ +	100% „	75% „
„ 8^h	+ +	100% „	80% „

Aus dem letzten Versuche geht hervor, daß die prozentuale Zunahme der Färbung im hängenden Tropfen, welcher dauernd im Mikroskop beobachtet wurde (Zimmertemperatur) viel schneller verläuft, als die Färbung in einer größeren Flüssigkeitsmenge, wo die Bakterien dem Einfluß des Lichtes zum Teil entzogen sind. Noch nach 8 Stunden waren in dem

Gemisch 20% nicht gefärbt, während im einfachen hängenden Tropfen, der unter dem Mikroskop lag, schon nach 3 Stunden alle Bakterien gefärbt waren. Das Wachstum war nach 6 Stunden zwar etwas behindert, aber immer noch deutlich. Auch hier sistierte sofort mit der Färbung die Bewegung.

Versuch 3.

Zu diesem Versuche diente eine gesättigte Methylenblaulösung in Bouillonlösung I, ferner eine Aufschwemmung einer Mäusethyhus-Schrägagarkultur in Bouillon. Mittels einer Pipette wurden von dieser Aufschwemmung je 2 ccm in 6 Reagensgläser gefüllt, zu jedem der Reagensgläser von der Farblösung

		das heißt also Farbkonzentration
1.) + 1 ccm Lös. I		1.) 1:2
2.) + 0,5 „ „	+ 0,5 ccm Bouillon	2.) 1:5
3.) + 0,25 „ „	+ 0,75 „ „	3.) 1:10
4.) + 0,1 „ „	+ 0,9 „ „	4.) 1:30
5.) + 1 Tropfen „	+ 0,99 „ „	5.) 1:60
6.) +	+ 1,0 „ (Kontrolle)	6.) Kontrolle ohne Farbe

Die Prüfung auf Färbung geschah im hängenden Tropfen nach 1^h, 2^h, 4^h, 8^h, 22^h, 24^h. Die Lösungen waren dem Licht ausgesetzt und standen bei Zimmertemperatur, ca. 18 Grad. Ergebnis über Färbung und Bewegung in Tabelle 3. Gleichzeitiger Versuch mit Bact. Coli ging unter denselben Bedingungen vor sich.

Tabelle 3

Einwirkungsziel	1^h	2^h	4^h	8^h	22^h	24^h
Färbung der Bakterien	1) 33% gef. 2) 20% „ 3) 10% „ 4) 2% „ 5) einige „ 6) ungef. u bewegl.	1) 60% gef. 2) 50% „ 3) 35% „ 4) 20% „ 5) 10% „ 6) ungef. u. bewegl.	1) 90% gef. 2) 80% „ 3) 60% „ 4) 50% „ 5) 25% „ 6) ungef. u bewegl.	1) 95% gef. 2) 90% „ 3) 80% „ 4) 60% „ 5) 30% „ 6) ungef. u. bewegl.	1) 50% gef. 2) 30% „ 3) 20% „ 4) 10% „ 5) 5% „ 6) ungef. u. bewegl.	1) 60% gef. 2) 40% „ 3) 30% „ 4) 15% „ 5) 10% „ 6) ungef. u. bewegl.
Bewegung	gefärbt unbewegl. Rest beweglich	wie bei 1^h	wie bei 1^h	wie bei 1^h	wie bei 1^h	wie bei 1^h

Bei diesem Versuche konnte folgende Beobachtung gemacht werden:

1. Der Prozentsatz der gefärbten Bakterien im Verhältnis zu den ungefärbten steigert sich in den ersten Stunden der Einwirkung des Farbstoffes. Diese Erscheinung hängt offenbar eng zusammen mit der Wachstums- und Absterbeordnung.
2. Die Färbung beginnt zuerst an den Polen, um bald danach diffus den ganzen Bakterienleib zu durchtränken.
3. Im selben Moment der beginnenden Färbung sistiert die Beweglichkeit, es tritt also gleichzeitig eine Hemmung einer Lebensfunktion ein.
4. Der Prozentsatz der gefärbten Individuen geht der Farbkonzentration deutlich parallel. Daß das Verhältnis nach 22^h und 24^h scheinbar verwischt ist, beruht auf der Vermehrung der resistenten Bakterien in dem guten Medium (Bouillon).

Versuch 4.

Es wurden schwächere Lösungen von Methylenblau mit Bouillon angesetzt und zwar. 1 : 15, 1 : 30, 1 : 60, 1 : 90, 1 : 120 und als Kontrolle Bouillon ohne Farbe. In diese Lösungen wurden einige frische Mäusetyphuskulturen verrieben. Zählplatten wurden nur von Methylenblau-Lösung 1 : 120 angelegt: sofort, 2^h, 4^h, 6^h, 8^h.

Tabelle 4

	Konzentration	Einwirkungszeit				
		sofort	2^h	4^h	6^h	8^h
Färbung der Bakterien	1 : 15	Einzelne gefärbt	60% gef.	70% gef.	70% gef.	75% gef.
	1 : 30	„	40% „	45% „	45% „	50% „
	1 : 60	Keine Färbung	Einzelne gefärbt	Einzelne gefärbt	Einzelne gefärbt	10% „
	1 : 90	„	Keine Färbung	Keine Färbung	Keine Färbung	Einzelne gefärbt
	1 : 120	„	„	„	„	Keine Färbung
	Kontroll.	—	—	—	—	—

Tabelle 4a

Verdünnung : 1 : 1000000					
Anlegungszeit der Platten	sofort	2 h	4 h	6 h	8 h
Wachstum auf Platten	750 Rasen	570 Rasen	650 Rasen	1030 Rasen	950 Rasen
Wachstum auf Kontrollplatten	850 Rasen	950 Rasen	1010 Rasen	1650 Rasen	1430 Rasen

Man ersieht aus diesem Versuch deutlich wieder den Parallelismus zwischen Farbkonzentration uud Färbung bei Methylenblau. Auffallend ist das Ausbleiben der Färbung, wenn man die Farbe etwas stärker verdünnt. Es addiert sich aber hier die starke Schutzwirkung der Bouillon. Die Beweglichkeit sistierte auch hier mit der Farbaufnahme. Die Wachstumsbehinderung war in der schwachen Konzentration 1 : 120 minimal.

Versuch 5.

Von gesättigter Methylenblau-Lösung wurden Verdünnungen hergestellt mit Bouillon und zwar: 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600. Von jeder dieser Verdünnungen wurde je 1 ccm Farblösung in Reagensgläser gebracht, die je 2 ccm Mäusetyphusaufschwemmung in Bouillon enthielten, sodaß also Farbkonzentrationen von 1 : 300, 1 : 600, 1 : 1200, 1 : 2400, 1 : 4800 entstanden. Alle Lösungen wurden bei Zimmertemperatur gehalten und nach verschiedenen Zeiten mittels hängenden Tropfens kontrolliert. In den Reagensgläsern trat eine Färbung der Bakterien bis 24 h nicht ein.

Versuch 6.

Da das Licht anscheinend starken Einfluß auf die Färbung der Bakterien hat, wurden 1 ccm Mäusetyphus-Aufschwemmung + 1 ccm gesättigte Methylenblau-Lösung, beide Lösungen in Bouillon, bei Zimmertemperatur in einen dunklen Schrank gestellt und dauernd in hängendem Tropfen kontrolliert. Nach 48 h waren ein Drittel gefärbt und unbeweglich. Nach vier Wochen waren einige noch nicht gefärbt. Nach sechs Wochen

bestand Totalfärbung. Einige Oesen wurden davon auf Agarplatten verstrichen und zeigten merkwürdigerweise gutes Wachstum. Ein Deckgläschen mit hängenden Tropfen aus der obigen Konzentration am ersten Tage angesetzt, wurde 24 Stunden in einen dunklen Schrank verbracht und zeigte keine Färbung, vier Stunden ans Licht gebracht, trat Totalfärbung ein. Der Tropfen wurde darauf auf eine Agarplatte verstrichen und zeigte nach 24 Stunden gutes Wachstum. Aus diesem Versuche ist deutlich der enorm starke Einfluß des Lichtes zu ersehen, ein Umstand, der von vielen Autoren früher wenig oder garnicht beobachtet wurde.

Versuch 7.

Gänzlich andere Resultate erhält man, wenn Bakterien auf gefärbten festen Nährböden gezüchtet werden. Dies illustriert folgender Versuch: Mythylenblau wurde in aqua dest. gelöst und zwar: konzentriert, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 60, 1 : 80, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 500, 1 : 1000.

Von diesen Verdünnungen kamen je 1 ccm zu 9 ccm flüssigem Agar. Wir erhielten so Verdünnungen 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500, 1 : 600, 1 : 800, 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 5000, 1 : 10000 der gesättigten Farbstofflösung. Die Röhrchen wurden, nachdem sie sterilisiert, mit Mäusetyphus und Coli beimpft. Nach 24 Stunden bestand auf allen Wachstum, in den starken Konzentrationen allerdings etwas schwächer. Das Ergebnis der hängenden Tropfen, die mit physiologischer NaCl von diesen Kulturen angelgt wurden, in Tabelle 5.

Vermischungen von Farblösungen in Gele setzt trotz des vorhandenen Diffusionsvermögens von Farbe in Agar ganz andere Bedingungen. Nur in der stärksten Konzentration tritt eine Körnchenfärbung vereinzelter Bakterien ein. Der Grund kann einmal in der schnellen Vermehrung der Bakterien, ferner in der Abgabe von Sekretstoffen liegen. Auf jeden Fall ist das divergente Verhalten auf festen und flüssigen Nährböden höchst bemerkenswert.

Um nun auch die Verhältnisse der anderen Farben zu studieren, wurden im folgenden Versuche zunächst Brillant-

benzoeblau 6 B. verwandt, welches sich bei ausgedehnten Untersuchungen im Hygienischen Institut zu Düsseldorf als eine ausgezeichnete Vitalfarbe für Tiere erwiesen hatte.

+ = einzelne Kolonien, ++ = mehrere Kolonien
+++ = viele Kolonien.

Tabelle 5

Konzentration der Methylenblau-Lös.	Kolonien auf den Mäusetyph. Röhrchen	Färbung im hängenden Tropfen bei Mäusetyphus	Kolonien auf den Coliröhrchen	Färbung im hängenden Tropfen bei Coli
1:10	+	Einzeln. Ektoplasmafärbung Einzelne halb gefärbt	+	Einzelne ganz, einzelne Pol- u. Körnchenfärb.
1:20	++	Einzelne Pol- u. Körnchenfb.	++	Einzelne Pol- u. Körnchenfärbg.
1:50	++	Keine Färbg.	++	Einz. schwache Pol- u. Körnchtbg.
1:100	+++	„ „	+++	Ganz vereinzelt schwache Polfrbg.
1:200	+++	„ „	+++	Keine Färbung
1:500	+++	„ „	+++	„ „
1:600	+++	„ „	+++	„ „
1:800	+++	„ „	+++	„ „
1:1000	+++	„ „	+++	„ „
1:2000	+++	„ „	+++	„ „
1:4000	+++	„ „	+++	„ „
1:5000	+++	„ „	+++	„ „
1:10000	+++	„ „	+++	„ „

Versuche mit anderen Farbstoffen.

Versuch 8.

Von Brillantbenzoeblau 6 B. wurde eine gesättigte filtrierte und sterilisierte Lösung in Bouillon hergestellt, = Lös. I, ferner

von einer 24stündigen Mäusetyphus Schrägagarkultur einer in 5 ccm-Bouillon deutlich getrübte Aufschwemmung. Mittels einer Pipette wurden von dieser Aufschwemmung je 2 ccm in 6 Reagensgläser gebracht. Dann zu jedem der Reagengläser die Lösung I im Verhältnis: 1 : 2
1 : 5
1 : 10
1 : 30
1 : 60
Kontrolle

Die Prüfung auf Färbung geschah im hängenden Tropfen nach 1^h, 2^h, 4^h, 6^h, 8^h, 22^h, 24^h. Die Lösungen waren vor Licht geschützt und standen bei Zimmertemperatur bei ca. 18^0. Ergebnis in Tabelle 6.

Tabelle 6

Einwirkungszeit	1^h	2^h	3^h	6^h	8^h	22^h	24^h
Färbung d. Bakter.	—	—	—	—	—	—	—
Bewegung . . .	gut	gut	gut	gut	gut	gut	gut

So kann also die sehr bemerkenswerte Tatsache festgestellt werden, daß ein Farbstoff, welcher Warmblüter ganz ausgezeichnet vital färbt (Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse, nach Versuchen von Herrn Professor Dr. Bürgers) bei gramnegativen Bakterien bis zu 24 Stunden bei Zimmertemperatur garnicht vital färbt. Daß auch keine Giftwirkung eintritt, zeigt die vollkommen erhaltene Beweglichkeit der Bakterien.

Versuch 9.

Im folgendem Versuch geht die Färbung der Bakterien nicht im Reagensglas vor sich, sondern nur im hängenden Tropfen und zwar wurde eine Oese Aufschwemmung + eine Oese Farbverdünnung auf ein Deckgläschen gebracht und unter dem Mikroskop so lange bei Tageslicht beobachtet, bis die Färbung eintrat. Dann wurde das Deckglas gewendet und der Tropfen mit einer Oese auf einer Agarplatte verstrichen und das Wachstum nach 24 Stunden festgestellt. Von Farb-

stoffen wurden angewandt: Methylenblau, Kristallviolett, Brillantbenzoeblau, Trypanrot und Fuchsin S. Aus gesättigten Lösungen wurden Verdünnungen hergestellt im Verhältnis: 1 : 5, 1:50, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 5000, 1 : 10000 in aqua dest. und die Mäusetyphus-Aufschwemmung in Bouillon. Ergebnis Tabelle 7

+ + + = unbehindertes Wachstum.

Tabelle 7

Farbstoff	Konzentration	Eintritt der Färbung im hängenden Tropfen	Kolonien-Wachstum auf Agarplatte
Methylenblau	1:50	3 h	+ + +
Kristallviolett	1:5	3 h	+ + +
„	1:50	4 h	+ + +
Brillantbenzoeblau	1:5	—	+ + +
Trypanrot	1:5	—	+ + +
Fuchsin S	1:2	—	+ + +

Unter den oben angegebenen Versuchsbedingungen zeigt auch neben Brillantbenzoeblau die bekannte Vitalfarbe Trypanrot und der saure Fuchsin kein Vitalfärbungsvermögen. Der Zeiteintritt der Vitalfärbung ist bei den einzelnen Farben verschieden. Das Wachstum sofort nach Eintritt der Färbung geprüft, ist gegenüber der Kontrolle, nicht behindert. Es vergeht eben immer eine bestimmte Zeit vom Eintritt der Färbung bis zum Tode des Bakteriums.

Versuch 10.

Zu diesem Versuche werden 1 ccm von einer gesättigten Kristallviolettlösung mit aqua dest. + 1 ccm Mäusetyphus-Aufschwemmung in aqua dest. angesetzt, um die Zeit des Absterbens der Bakterien nach Eintritt der Färbung zu bestimmen. Totalfärbung der Bakterien trat ein nach 2 Stunden. Ergebnis Tabelle 8.

Ergebnis: Wegen der Verwendung von Aqua dest. als Medium haben wir wieder klare Verhältnisse. Bei dieser Farbe geht also Färbung und Abtötung nahezu parallel. Es zeigt

sich aber hier die schon aus früheren Arbeiten bekannte giftige Wirkung des Kristallvioletts, welches ja aus diesen Gründen praktisch in der Bakteriologie verwendet wird. (Drigalski Agar).

Tabelle 8

Beobachtungszeit	Wachstum auf den Platten	Färbung im hängenden Tropfen
Sofort	Gutes Wachstum	80% gefärbt
Nach 1 h	„ „	85% „
„ 2 h	Kein „	100% „
„ 3 h	„ „	100% „
„ 4 h	„ „	100% „

Versuch 11.

Zu diesem Versuche wurde eine gesättigte Lösung von Nilblau B. B H., ein basischer Farbstoff, angesetzt. 1 ccm Nilblaulösung mit Aqua dest. + 1 ccm Aufschwemmung von Mäusetyphus in Aqua dest., hängende Tropfen von dieser Lösung wurden dem Lichte ausgesetzt. Gleichzeitig wurde derselbe Versuch im Dunkeln durchgeführt. Färbung und Absterben in Tabelle 9. Mit Eintritt der vollständigen Färbung hört die Bewegung auf.

Tabelle 9

Konzentration	Färbung im hängenden Tropf. bei Licht und im Dunkel nach	Absterben nach Eintr. der Färbung in	Beobachtungszeit
Gesättigt. Lös.	1 Stunde	1½ Stunde	Beobachtet bis 30 Stunden
1 : 20	2 „ Körnchen der Bakt. gefärbt	30 „	
1 : 200	Keine Färbung	—	

Konzentrierte Lösungen dieser Farbe wirken also noch schneller als Methylenblau. Die Lebensfähigkeit ist namentlich in der schwächeren Lösung beträchtlich lange Zeit erhalten,

während die Bewegung mit vollständiger Färbung verschwindet. Der Einfluß des Lichtes macht sich bei dieser Farbe nicht bemerkbar.

Versuch 12.

Ähnlich wie der letzte Versuch wurde ein Versuch mit Neublau R (basisch) angesetzt. 1 ccm gesättigte Lösung in Aqua dest. + 1 ccm Mäusetyphusaufschwemmung in Aqua dest. Hängende Tropfen im Licht und Dunkel und zwar bei Zimmertemperatur. Färbung und Absterben aus Tabelle 10 ersichtlich.

Tabelle 10

Konzentration	Färbung im hängenden Tropf. bei Licht und Dunkel nach	Absterben nach Eintritt der Färbung in	Beobachtungszeit
Ges. Lösung	3 h	$2^1/_2$ h	
1 : 20	2 h Körnchenfärbung	Kein Absterb.	Beobachtet bis
1 : 200	2 h ganz schwache Körnchenfärbung	„ „	6 h

Das Absterben in der konzentrierten Lösung geht relativ schnell vor sich. Schwächere Lösungen färben nur partiell und behindern das Wachstum nicht. Der Einfluß des Lichtes macht sich hier nicht bemerkbar.

Versuch 13.

Rhodulinrot G. (basisch) wurde genau unter denselben Bedingungen angesetzt wie Versuch 12. Bei weiteren Verdünnungen trat keine sofortige Färbung ein. Siehe Tabelle 11.

Versuch 14.

In ähnlicher Weise, wie in den vorigen Versuchen wurde Janusgrün B., Cölestinblau B., Brillantalizarinblau G., Neutralviolett und Trypanblau angewandt, (abgesehen von letzteren sind alle Farbstoffe basisch). Die Mischungen setzen sich zusammen aus 1 ccm Farblösung in Aqua dest. + 1 ccm Mäuse-

typhus-Abschwemmung in Aqua dest. Der Versuch wurde durchgeführt in Licht und Dunkel bei Zimmertemperatur. Ergebnisse Tabelle 12.

Tabelle 11

Konzentration	Färbung im hängenden Tropfen bei Licht u. Dunkel nach	Absterben nach Eintritt der Färbung in	Beobachtungszeit
Ges. Lösung	$2^1/_2{}^h$	27^h	bis 30^h
1:5	$2^1/_2{}^h$	30^h	
1:50	3^h	30^h	
1:100	—	—	

Hier ist die lange Lebensdauer nach Eintritt der Färbung besonders auffallend.

+ + + = Wachstum gut.

Tabelle 12

Farbstoff	Konzentration	Färbung im hängenden Tropfen nach	Wachstum auf Agarplatten nach Eintritt der Färbung
Janusgrün . .	Ges. Lösung	96 Std.	+ + +
Coelestinblau .	„ „	80 „	+ + +
Brillantalizarinblau . . .	„ „	nach 100 Std. keine Färbung	
Neutralviolett .	„ „	30 Std.	+ + +
Trypanblau .	„ „	80 „	+ + +

Das schlechte Vitalfärbungsvermögen der letzten Farben, welche auch keine giftige Wirkung enthalten, ist offensichtlich. Die Gründe sollen am Schluß erläutert werden.

Versuch 15.

Die sämtlich bis jetzt angeführten Farbstoffe wurden jetzt angewandt zur Färbung von grampositiven Bakterien. Und

zwar bei Staphylococcus albus in konzentrierten und verdünnten Lösungen in Aqua dest. Ebenso war die Aufschwemmung in Aqua dest., um möglichst einfache Versuchsbedingungen zu schaffen. Siehe Tabelle 13.

Tabelle 13

Einwirkung der Farbstoffe auf Staph. albus.

Farbstoff	Konzentration	Eintritt der Färbung	Färbung der auf 100°erhitzt. Bakt. bis zu einer Konzentration von
Rhodulinrot . . .	ges. Lösung	sofort	
„ . . .	1:2 – 1:1000	„	1:1200
Kristallviolett . . .	ges. Lösung	„	
„ . . .	1:5 – 1:1100	„	1:1200
Methylenblau . . .	ges. Lösung	„	
„ . . .	1:5 – 1:800	„	1:1000
Nilblau	ges. Lösung	„	
„	1:5 – 1:50	„	1:50
Neublau	ges. Lösung	„	
Neutralviolett . . .	„ „	„	
Coelestinblau . . .	„ „	1 h	
Janusgrün	„ „	1 h	
Fuchsin S.	„ „	48 h	
Brillantbenzoeblau .	„ „	30 h	
Brillantalizarinblau .	„ „	30 h	
Trypanrot	„ „	30 h	
Trypanblau	„ „	30 h	

Der Versuch zeigt, daß Staphylococcus albus, ein grampositives Bakterium, bei allen untersuchten Farbstoffen sich wesentlich schneller färbt als der gramnegative Mäusetyphus. In dem vorigen Versuche, wo auch abgetötete Kokken (erhitzt)

geprüft wurden, ergab sich kein erheblicher Unterschied gegenüber lebenden Kokken.

Versuch 16.

Ob die Bakterien nach der Färbung noch leben, bezw. sich vermehren oder nicht, wurde außerdem im Tierversuch geprüft. Dabei leitete uns auch der Gedanke, ob es möglich wäre, eine Methode zu finden, den Transport von gefärbten aber noch lebenden Bakterien zu studieren. Es wurde eine Lösung hergestellt von 1 ccm Methylenblau + 1 ccm Aufschwemmung von Staphyloloccus aureus, beides in Aqua dest. Nach vollständiger Färbung wurde einem Meerschweinchen davon 1) 1 ccm subcutan eingespritzt. In gewissen Abständen wurde die Injektionsstelle punktiert und mit dem noch schwach gefärbten Inhalt Platten und Bouillonröhrchen beimpft. Sowohl auf den Platten, wie auch in den Bouillonröhrchen war nach 24 Stunden gutes Wachstum von Staphylococcus aureus vorhanden. Die durch die Punktierung erhaltene Flüssigkeit zeigt im hängenden Tropfen neben gefärbten stets ungefärbte Bakterien, die offenbar durch Wachstum entstanden waren. 2) Ebenso wurde eine Maus mit 0,5 ccm Methylenblau-Lösung + Aureus-Aufschwemmung nach eingetretener Färbung intraperitoneal geimpft. Der Erfolg war derselbe wie bei den Meerschweinchen. Die mit Flüssigkeit des Peritoneums beimpften Platten und Bouillonröhrchen zeigten gutes Wachstum von Staphylococcus aureus. Der oben angeführte Gedanke ließ sich also nicht verwirklichen, weil die gefärbten Bakterien sich im Tierkörper vermehrten und dadurch eine Beobachtung der gefärbten erschwerten. Dieselben Versuche wurden durchgeführt mit Neublau und Kristallviolett, bei diesen war allerdings nie ein Wachstum zu verzeichnen.

Versuch 17.

Um eventuell den Schädigungsgrad der Bakterien durch andere Einflüsse mittels vitaler Färbung festzustellen, (cf. d. Versuche von Seiffert) wurden vier Reagensgläser und zwar:

5 ccm Bouillon + 1 Öse Mäusetyphus
5 „ phys. NaCl + 1 „ „

5 ccm Bouillon + 1 „ Staph. aureus
5 „ phys. NaCl + 1 „ „ „

in den Brutschrank bei 37° gesetzt und von Zeit zu Zeit hängende Tropfen gemacht und zwar 1 Öse der Kulturen + 1 Öse Kristallviolett 1 : 10 gemischt. Der Versuch wurde 100 Stunden durchgeführt. Gleichzeitig wurden Zählplatten angelegt, wobei 1 Öse Kultur auf 10 ccm Agar kamen. So konnte man beobachten, daß nach den ersten drei Stunden eine Abnahme der Bakterien in den Zählplatten eingetreten war. Das Wachstum steigerte sich aber wieder bis zum Höchststand bei 31 Stunden. Dann trat bis zu 100 Stunden die allmähliche Schädigung wieder ein. Parallel den Schädigungen in den Kulturen trat auch immer die Färbung ein. So enthielten in der ersten Stunde die Platten nur noch 70 - 80000 Kolonien und nach 100 Stunden ungefähr 7 - 10000 Kolonien. Nähere Ergebnisse in Tabelle 14.

Versuch 18.

Um die Diffusion der Farbstoffe zu prüfen, wurde folgender Versuch gemacht. Es wurden 15 cm lange Glasröhrchen mit Durchmesser von 2 mm, an beiden Seiten offen, mit 20% iger Gelatine gefüllt und erstarren lassen. Nach Erstarrung wurden die Röhrchen außen sorgfältig gereinigt und in 2% ige Lösungen der einzelnen Farbstoffe eingelegt, sodaß sie vollständig von Farbe bedeckt waren. Dann wurden sie zu bestimmten Zeiten mit der Pinzette herausgenommen und auf Millimeterpapier die Diffusion von beiden Seiten abgelesen. (Siehe Tabelle 15.)

Wenn man namentlich die Diffusion in der ersten Zeit berücksichtigt, so kann man sich des Eindruckes nicht erwehren, daß zwischen sogenanntem Vitalfärbungsvermögen und Diffusionsfähigkeit in Gelen ein gewisser Parallelismus besteht. Daß er nicht absolut vollkommen ist, kann durch verschiedene Größe des Farbmoleküls, verschiedene Giftigkeit und eventuell noch durch unbekannte Momente erklärt werden.

Ich bin mir wohl bewußt, daß diese Arbeit nur die ersten orientierenden Versuche auf diesem schwierigem Gebiete darstellt, und daß die Ergebnisse auch nur für die geschriebene Technik Gültigkeit haben.

Tabelle 14

Stundenzahl	1 h	4 h	6 h	24 h	31 h	49 1/2 h	53 h	75 h	100 h
Staph. Aur. in phys. NaCl.	77000	10000	20000	13000	70000	10000	16000	12000	10000
Staph. Coccus aur. i. Bouill.	50000	12000	18000	15000	52000	18000	26000	13000	15000
Mäus. Typhus i. phys. NaCl.	60000	16000	14000	25000	40000	14000	28000	7000	9000
Mäus. Typhus i. Bouillon .	58000	15000	12000	23000	80000	12000	29000	5500	10000
Färbung									
Aureus i. phys. NaCl. . .	Total gef.	Tot. gef.	1/3 tot. gef. Restkörnchen	Total	Total	Total	Total	Total	Total
Aureus in Bouillon . . .	Körnch.-färbung	Einig. Tot, Restkörnchenfärb.	Wie 4 h	1/2 tot., 1/2 Körnchenfärb.	Wie 1 h	„	„	2/3 total 1/3 Körnchenfärb.	„
Mäus. Typh. in phys. NaCl.	2/3 total 1/3 Körnchenfärb.	1/3 nicht gefärbt	1/5 nicht gefärbt	Total	Wie 1 h	„	„	3/4 total 1/4 Körnchenfärb.	Einige nicht gefärbt
Mäuse-Typh. in Bouillon .	Einige gef.	1/4 gefärbt	1/3 gefärbt	1/5 gefärbt	Wie 1 h	3/4 total 1/4 Körnchenfärbung	3/4 total 1/4 Körnchenfärbung	1/4 total Rest Körnch.-färbung	1/3 nicht gefärbt

Tabelle 15

Farbstoff	5½ h	22 h	48 h	72 h	96 h
Rhodulinrot	3½ mm	7 mm	13 mm	20 mm	23 mm
Methylenblau	2 „	8 „	12 „	15 „	18 „
Kristallviolett	3 „	7 „	10 „	14 „	16 „
Nilblau	½ „	3 „	6 „	9 „	10 „
Neublau	2½ „	5 „	5 „	7 „	9 „
Fuchsin S.	½ „	4 „	5 „	7 „	9 „
Janusgrün	— „	1½ „	3 „	5 „	6 „
Coelestinblau	½ „	1 „	3 „	5 „	7 „
Trypanrot	2 „	4 „	5 „	7 „	10 „
Neutralviolett	1½ „	4 „	5 „	nicht zu beurteil.	
Brillantalizarinbl.	—	—	—	—	—
Brillantbenzoelbl.	1 „	2 „	3 „	5 „	6 „
Trypanblau	1 „	3 „	5 „	6 „	7 „

Deutlich sieht man, wie groß der Unterschied ist je nach Farbe, Medien, Temperatur und Belichtung. Trotz der vielen noch auszufüllenden Lücken glaube ich aber folgende Schlüsse ziehen zu dürfen:

1. Eine echte Vitalfärbung im Sinne der oben genannten Definition gibt es nicht. Denn wie die Versuche an beweglichen Bakterien zeigen, tritt mit Färbung sofort Stillstand ein. Da trotzdem Lebensfähigkeit, Wachstum, Infektionsfähigkeit bei den einzelnen Farben verschieden lang bestehen bleibt, kann man nur von einer relativen Vitalfärbung sprechen. Diese Feststellung läßt es geboten erscheinen, auch die Ergebnisse der Vitalfärbung bei Warmblütern einer neuen strengeren Kritik zu unterwerfen.
2. Es besteht ein großer Unterschied zwischen grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen. Erstere färben sich schnell, letztere leisten mehr Wiederstand. Es müssen also physikochemische Unterschiede im Bau des Protoplasmas vorliegen. Die bekannten Unterschiede in der

Plasmolysierbarkeit, Autolyse, Verhalten gegen das D'Herelle-sche Virus hätten eigentlich das umgekehrte Verhalten bei der sogenannten Vitalfärbung erwarten lassen.

3. Bei Methylenblau spielt das Licht eine sehr große Rolle.
4. Zwischen Färbungs- und Diffusionsvermögen besteht ein gewisser Parallelismus, eine Bestätigung der schon früher geäußerten Ansicht Schulemann's.

LITERATUR

Eisenberg, Ph., Centr.-Bl. f. Bact. Bd. 71, S. 420.

„ Centr.-Bl. f. Bact., Abt. I. Orig. Bd. 49, 1909 S. 465 – 492.

„ Centr.-Bl. f. Bact. Bd. 53, 1910, S. 481—485.

„ dto., Bd. 56, 1910, S. 193—201.

„ dto., Bd. 56, S. 183—186.

„ dto., Abt. I. Ref. Bd. 54, 1912, Beiheft, Seite 145—153.

Nakanishi, Centr. Bl. f. Bact., Abt. I., Bd. 30, Seite 97, 145, 193, 225. Bd. 27, S. 547.

Seiffert, Centr.-Bl. f. Bact., Bd. 88, S. 151—158.

Reichert, Centr.-Bl. f. Bact., Bd. 87.

Schulemann, Biochem. Zeitschr.

Heidenhain, Plasma u. Zelle, Jena.

Kioyone, Vitale Karminspeicherung, Jena 1914.

Goldmann, Beitr. z. klin. Chirurgie, 1909, 1911, 1912.

Kayser, Centr.-Bl. f. Bact., Orig. 62.

Isabolinski, Anilinfarbstoffe, Centr.-Bl. f. Bact., Orig. 73.

Pelet-Jolivet, Theorie des Farbprozesses, Dresden 1918.

Lebenslauf.

Ich, Carl Dahmen, wurde geboren am 25. November 1899 zu Roedingen, Kr. Jülich Rhld. Bis zu meinem 14. Lebensjahre besuchte ich die Volksschule, hierauf das Gymnasium zu Jülich, wo ich auf Quarta eintrat. Durch meinen Eintritt ins Heer im Juni 1917 habe ich das Studium bis Ende des Krieges unterbrochen. Besuchte dann den Kriegsteilnehmer-Kursus an dem Gymnasium zu M.-Gladbach, wo ich Juli 1920 meine Reifeprüfung ablegte. Sodann bezog ich im Winter-Semester 1920/21 die Tierärztliche Hochschule zu Hannover. Während der nächsten drei Semester studierte ich an der Universität Gießen, wo ich Anfang Sommer-Semester mein Tentamen physikum bestand. Kehrte dann wieder nach Hannover zurück und bestand hier zu Anfang des Sommer-Semesters 1926 meine tierärztliche Fachprüfung. Im Herbst 1926 habe ich mich im hygienischen Institut der Medizinischen Academie zu Düsseldorf mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.